

대장균에서의 Chaperone 동시 발현을 통한 *Candida antarctica* Lipase B 발현 시스템 구축

정 상 민 · 임 애 경 · † 박 경 문

홍익대학교 화학시스템공학과

(접수 : 2008. 3. 21., 게재승인 : 2008. 8. 13.)

Construction of *Candida antarctica* Lipase B Expression System in *E. coli* Coexpressing Chaperones

Sang-Min Jung, Ae-Kyung Lim, and Kyungmoon Park†

Department of Chemical System Engineering, Hongik University, Jochiwon, Chungnam 339-701, Korea

(Received : 2008. 3. 21., Accepted : 2008. 8. 13.)

Recently, *Candida antarctica* lipase B (CalB) draws attention from industries for various applications for food, detergent, fine chemical, and biodiesel, because of its characteristics as an efficient biocatalyst. Since many industrial processes carry out in organic solvent and at high temperature, CalB, which is stable under harsh condition, is in demand from many industries. In order to reform CalB promptly, the expression system which has advantages of ease to use and low cost for gene libraries screening was developed using *E. coli*. The *E. coli* strains, RosettaGami with competence for enhanced disulfide bond formation, Novablue, and DH5 α , were exploited in this study. To obtain the soluble CalB, the pCold I vector expressing the cloned gene at 15°C and the chaperone plasmids containing groES/groEL, groES/groEL/tig, tig, dnaK/dnaJ/grpE, and dnaK/dnaJ/grpE/groES/groEL were used for coexpression of CalB and chaperones. The colonies expressing functional lipase were selected by employing the halo plate containing 1% tributyrin, and the CalB expression was confirmed by SDS-PAGE. *E. coli* RosettaGami and DH5 α harbouring groES/groEL chaperones were able to express soluble CalB effectively. From a facilitative point of view, *E. coli* DH5 α is more suitable for further mutation study.

Key Words : *Candida antarctica* Lipase B, CalB, *E. coli*, Coexpression, Chaperone

서 론

산업적으로 응용되고 있는 많은 효소들 가운데 lipase (glycerol ester hydrolases, E.C.3.1.1.3)가 차지하는 역할은 매우 중요하며 급속히 성장하고 있는 근대 생물산업에서 가장 중요하게 주목 받고 있는 효소 중의 하나로서 세제, 식품, 섬유, 화학 산업, 의약분야 등에서 높은 잠재력을 가지고 응용이 되고 있다(1). 많은 산업 분야에서 사용되어지고 있는 lipase란 다양한 범위의 수용성 혹은 비수용성 carboxylic acid ester나 amide의 가수 분해 혹은 합성을 촉진하는 효소를 말하며 일반적으로 유지질의 분해 또는 합성효소로 말할 수 있다(2-4).

Lipase는 유기용매에서의 반응성, 조효소가 필요 없다는 점, 이성질체 선택성 등의 여러 장점을 가지고 있다. 그러나 다른 효소들과 같이 생산 단가가 비싸고, 고온이나 유기용매 상에서 불활성화되는 문제점이 있다. 특히 lipase를 산업적으로 활용하기 위해서는 유기용매상에서 안정성이 개선된 lipase의 대량 생산이 필요하다. 대량 생산시스템에 적용하기 이전에 개질된 lipase의 특성을 분석하기 위해서는 사용이 용이한 발현 시스템을 구축하여 개질된 lipase의 특성을 분석하는 일이 우선되어야 한다.

본 연구에서는 현재 다양한 산업 분야에서 넓게 이용되는 효소이면서 향후에 산업적 중요성이 더욱 증대될 것으로 예상되는 *Candida antarctica*에서 유래된 lipase B (CalB)의 발현 시스템을 구축하였다. CalB는 비수용성 상태에서도 에스터 합성과 전이에스테르화반응에 관여하며, 높은 입체특이성과 특별한 조효소 없이 반응을 진행하고 높은 열안정성과 넓은 범위의 pH 활성 범위를 지니고 있다(5-9). 다른 lipase과 비교해서 여러 반응조건에서도 반응효율이 좋으며 반응 시간이 짧다(10).

† Corresponding Author : Department of Chemical System Engineering
Hongik University, Jochiwon, Chungnam 339-701, Korea
Tel : +82-41-860-2429, Fax : +82-41-866-6940
E-mail : pkm2510@hongik.ac.kr

CalB의 발현을 위해 범용 발현시스템인 *E. coli* 3종을 사용하였다. CalB의 경우 3개의 이중황결합을 가지고 있으나, *E. coli*는 이황화 결합을 제대로 생성하지 못하여 내포체를 생성하는 단점을 지니고 있다(11-12). 이에 본 연구에서는 내포체의 생성을 저해하기 위해 저온 발현을 시켜서 발현 속도를 늦추는 방법과 단백질 접힘을 도와주는 chaperone을 동시에 발현시키는 방법을 선택하였으며, 이를 위해 CalB가 도입된 pCold plasmid와 chaperone plasmid를 동시에 사용하여 *E. coli*에서의 CalB의 발현시스템을 구축하였다.

재료 및 방법

균주 배양과 배지 조성

CalB의 발현시스템 구축을 위해 숙주세포로 *E. coli*의 대표적인 형질전환 균주인 DH5 α , 이중황결합의 생성이 강화된 RosettaGami, 높은 형질전환 효율과 도입된 유전자의 안정성이 높은 Novablue가 사용되었다(Table 1) (13-14). 균주는 Luria Bertani 배지에서 진탕배양기를 사용하여 180 rpm, 37°C에서 12~16시간 동안 키우게 된다. CalB가 재조합된 pCold I vector로 형질이 전환된 균주는 ampicillin (Sigma aldrich, USA) 50 μ g/ml를 함유한 배지에서 배양하고 chaperone 발현균주의 경우에는 chloramphenicol (Sigma aldrich, USA) 34 μ g/ml를 첨가한 후, 같은 조건의 진탕배양기에서 배양을 한다. 재조합된 pCold I vector와 chaperone vector가 모두 도입된 균주는 ampicillin, chloramphenicol을 각각 50 μ g/ml, 34 μ g/ml를 함유한 배지에서 배양한다. CalB의 발현을 위해서 재조합 균주는 37°C에서 O.D₆₀₀이 0.4~0.6이 될 때까지 배양한 후, 1 mM IPTG를 첨가하고 24시간 동안 15°C에서 배양한다.

Table 1. Genotype of the host cells

Strain	Genotype
RosettaGami	Δ (<i>ara-leu</i>)7697 Δ <i>lacX74</i> Δ <i>phoA</i> PvuII <i>phoR</i> <i>araD139</i> <i>ahpC</i> <i>galE</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> F ⁺ [<i>lac+</i> <i>lacI^s</i> pr o] <i>gor522::Tn10</i> <i>trxB</i> pRARE (Cam ^R , Kan ^R , Str ^R , Tet ^R)
Novablue	<i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (<i>r_{K12}</i> <i>m_{K12}</i> ⁺) <i>supE44</i> <i>thi1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lacF</i> ⁺ [<i>proA</i> ⁺ B ⁺ <i>lacI^s</i> Δ M15::Tn10] (Tet ^R)
DH5 α	F ⁺ - ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (<i>r_K</i> ⁺ , <i>m_K</i> ⁺) <i>phoA</i> <i>supE44</i> λ <i>thi1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i>

Vector와 chaperone plasmid

Cold shock 단백질을 코드하는 *cspA* (Cold Shock Protein) 유전자와 *cspA* promotor, 5' UTR, *cspA* 단백질의 N 말단을 코드하는 부분을 포함하고 있는 4407 bp 크기의 pCold I (Takara, Japan)을 CalB 발현 vector로 사용하였다(15). Chaperone 동시 발현을 위해 Takara (Japan)사의 pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pG-Tf2, pTf16 plasmid를 사용하였고 각 chaperone plasmid의 특징은 Table 2와 같다(16).

CalB 유전자 증폭 및 정제

CalB 유전자 (1023 bp)를 증폭하기 위해서 중합효소 연쇄

반응 (Polymerase chain reaction, PCR)을 이용하였다. 중합효소연쇄반응기는 Corbett Research CG1-96 (Australia)를 이용하였고 Solgent사 (Korea)의 Taq DNA Polymerase kit와 Pst I primer (AAT CTG CAG TCA GGG GGT GAC GAT), Sac I primer (AAT GAG CTC CTA CCT TCC GGT TCG)를 사용하였다. 생성된 CalB 유전자의 정제는 gel extraction kit (Bioprogen, Korea)를 이용하였다.

Table 2. Features of chaperone plasmids

Chaperone Plasmid	Chaperone	Promoter	Inducer	Resistant marker	Size (kb)
pG-KJE8	<i>dnaK-dnaJ-grpE</i> <i>groES-groEL</i>	<i>araB</i> <i>P_{t1}</i>	L-Arabinose Tetracyclin	Cm	11.1
pGro7	<i>groES-groEL</i>	<i>araB</i>	L-Arabinose	Cm	5.4
pKJE7	<i>dnaK-dnaJ-grpE</i>	<i>araB</i>	L-Arabinose	Cm	7.2
pG-Tf2	<i>groES-groEL-tig</i>	<i>P_{t1}</i>	Tetracyclin	Cm	8.3
pTf16	<i>tig</i>	<i>araB</i>	L-Arabinose	Cm	5.0

CalB 형질전환 균주 생성

PCR 생산물과 pCold I vector를 각각 Pst I (New England Biolabs, USA)과 Sac I (New England Biolabs, USA)으로 처리한 후, DNA Ligation kit Ver2.1 (Takara, Japan)을 사용하여 CalB가 재조합된 plasmid를 생성하였다. 준비된 competent cell과 혼합한 후, ampicillin을 함유한 LB agar plate에서 형질이 전환된 colony를 선별하였다. 선별된 colony를 LB배지에서 배양한 후, Cosmo genetech사 (Korea)에서 나온 Labo passTM Mini kit를 사용하여 plasmid를 정제하였다. 정제된 plasmid는 Pst I과 Sac I으로 처리한 후, 전기영동법을 통해 형질전환을 확인하였다.

Chaperone의 형질전환법

균주별로 competent cell을 제조하여 chaperone plasmid와 혼합한 후, chloramphenicol이 포함된 LB agar plate에서 배양하고 선별된 colony는 chloramphenicol을 함유한 LB배지에서 배양하고 전기영동법을 통해 형질전환을 확인하였다.

CalB와 chaperone 공동 발현균주 제작

DH5 α 의 경우, 먼저 CalB가 재조합된 plasmid로 형질을 전환시킨 후, ampicillin을 포함하는 배지에서 세포를 배양하여 재조합 plasmid를 포함하는 형질전환된 세포를 얻고 다시 competent cell을 제조하여 chaperone plasmid를 형질전환시킨다. Chloramphenicol과 ampicillin을 포함하는 agar plate에서 배양하여 재조합된 vector와 chaperone을 포함하는 균주를 얻는다. RosettaGami와 Novablue의 경우에는 이와 반대로 먼저 chaperone plasmid를 균주에 도입시키고 chloramphenicol만을 포함하는 배지에서 세포를 배양한 후, 다시 competent cell을 제조하여 재조합 vector를 형질전환시키고 chloramphenicol과 ampicillin을 포함하는 배지에서 배양하여 두 가지의 plasmid가 형질전환된 숙주세포를 얻는다.

Halo plate를 이용한 CalB 발현 확인

1%의 tributyrin (Sigma aldrich, USA)을 포함하는 LB agar

plate에서 균주를 배양한다. pGro7, pTf16 그리고 pKJE7가 도입된 균주는 1 mg/ml L-arabinose를 첨가시켜주고, pG-Tf2의 경우에는 5 ng/ml tetracycline을 포함시켜주고, pG-KJE8의 경우에는 1 mg/ml L-arabinose와 5 ng/ml tetracycline을 추가한다. 37°C에서 colony를 배양한 후, 1 mM IPTG (Fluka, Switzerland)를 사용하여 induction을 실시하고 15°C에서 24시간 배양한 후, CalB의 발현을 halo의 생성여부와 크기로 확인한다.

SDS-PAGE를 이용한 CalB 발현 확인

제조합 균주를 15°C에서 24시간 배양한 후, Homogenizer (IKA, Germany)를 이용하여 세포를 파쇄한다. 원심분리한 후, 상등액은 centrifugal filter device (Millipore, USA)를 이용하여 soluble 샘플을 농축하고 침전물은 insoluble 샘플로 채취한다. 단백질 전기영동기 (Bio-rad, USA)를 이용한 SDS-PAGE (separation gel 12%, stacking gel 4%)를 사용하여 CalB의 발현을 확인하였다.

결과 및 고찰

CalB 재조합 Plasmid 확인

Cal B 유전자와 pCold I vector의 재조합 plasmid로 형질이 전환된 DH5α로부터 plasmid를 정제하고 Pst I과 Sac I으로 처리한 후, DNA 전기영동을 통해 확인하였다(Fig. 1). Marker DNA (pBR322 DNA BstN I Digest, New England Biolabs, USA)를 사용하여 1058bp와 929bp band 중간에 위치한 CalB 유전자를 확인하였다. 다른 marker DNA (Lambda DNA Hind III Digest, New England Biolabs, USA)를 이용하여 pCold I vector의 존재를 확인하였다.

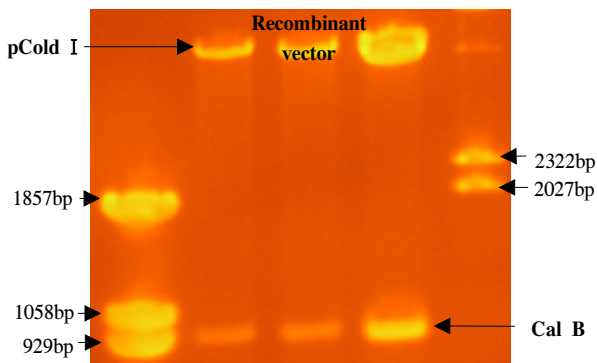


Figure 1. Gel electrophoresis of recombinant pCold plasmid containing Cal B (1% agarose gel).

CalB와 chaperone을 공동 발현하는 균주 제작

DH5α에 재조합 vector와 각 종의 chaperone들을 순차적으로 형질전환시킨 후, plasmid 정제과정을 거친 생성물들을 전기영동을 통해 확인하였다(Fig. 2). Chaperone plasmid의 형질전환이 없이 pCold 재조합 plasmid만을 형질전환시킨 결과를 pKJE7, pGro7, pG-KJE8, pTf16, pG-Tf2와 재조합 pCold plasmid를 각각 형질전환시킨 것을 비교하였다. CalB를 발현하는 재조합 plasmid만을 형질전환시킨 균주와 비교하면 chaperone이 공동 형질전환된 균주에서 chaperone plasmid의 존재를 확인할 수 있는 band가 확인되었다. pGro7의 경우 재조합 pCold

plasmid와 크기가 5400 bp 정도의 비슷한 크기를 가지고 있어 Fig. 2에서는 pGro7의 존재를 확인할 수가 없었다.

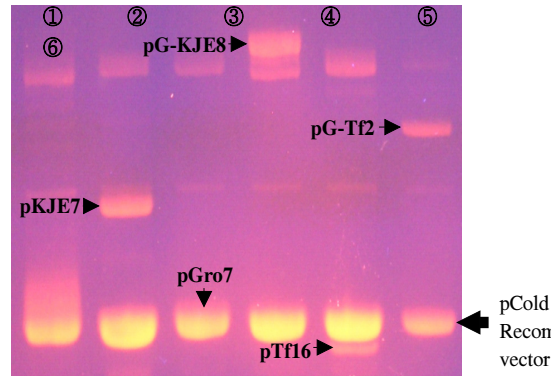


Figure 2. Gel electrophoresis of *E. coli* DH5α transformed by the recombinant pCold plasmid and 5 different chaperone plasmids (1% agarose gel) : ① pCold recombinant plasmid, ② pCold recombinant plasmid + pKJE7, ③ pCold recombinant plasmid + pGro7, ④ pCold recombinant plasmid + pG-KJE8, ⑤ pCold recombinant plasmid + pTf16, ⑥ pCold + pG-Tf2.

재조합 pCold plasmid와 pGro7의 공동 형질전환을 확인하기 위해 제한효소 처리를 실시한 후 전기영동을 통해 확인해 보았다(Fig. 3). 재조합 pCold plasmid와 pGro7을 제한효소 Pst I과 Sac I으로 각각 처리한 결과를 재조합 pCold plasmid와 pGro7이 공동 형질전환된 균주에서 정제된 plasmid들을 제한효소 Pst I과 Sac I으로 처리하여 비교하였다. 2종의 plasmid를 각각 분리하여 제한효소로 처리한 후에 나타나는 band들과 재조합 pCold plasmid와 pGro7이 공동 형질전환된 균주에서 정제된 plasmid를 제한효소로 처리한 후에 나타난 band들이 동일한 위치에서 관찰된 바, pGro7의 형질전환도 확인할 수 있었다. 동 실험을 통해 CalB가 재조합된 pCold plasmid와 5종의 chaperone plasmid가 각각 형질전환된 5종의 균주가 제작되었음을 확인하였다.

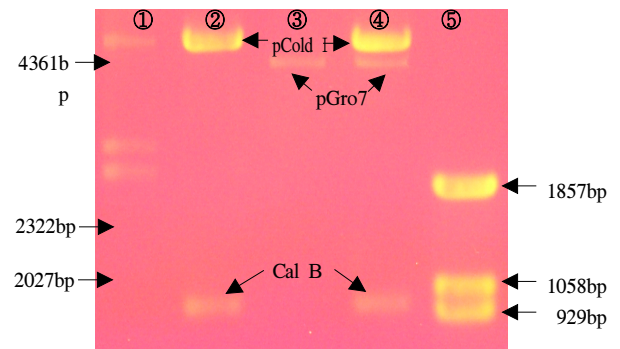


Figure 3. The results of restriction enzyme digestion of the recombinant pCold plasmid and pGro7 from *E. coli* DH5α (1% agarose gel) : ① marker, ② pCold recombinant plasmid (Pst I and Sac I), ③ pGro7 (Pst I and Sac I), ④ pCold recombinant plasmid + pGro7 (Pst I and Sac I), ⑤ marker.

Halo plate를 이용한 CalB 발현 확인

Halo는 CalB가 발현이 되면서 halo plate에 포함된 trybutyrin을 균주가 분해하면서 생기는 현상으로 colony의 주위에 생성되는

halo의 유무와 크기를 비교하여 균주의 CalB 발현을 확인하였다. Halo plate 실험결과 CalB가 도입된 3종의 *E. coli* 재조합균주에서 모두 CalB가 발현되는 것을 알 수가 있었으며, CalB와 5종의 chaperone plasmid를 공동 형질전환시킨 결과를 Table 3으로 정리하였다. Table 3은 각각의 균주에 대해 halo 크기를 비교한 것으로 groES/groEL 유전자를 가지고 있는 pGro7을 도입한 균주가 다른 chaperone plasmid를 도입한 균주에 비해 halo의 크기가 상대적으로 크게 나타났으며, DH5α와 Rossettagami가 Novablue에 비해 halo의 크기가 상대적으로 크게 나타났다. 그리고 tig 유전자를 가지고 있는 pTf16을 도입한 3종의 재조합 균주에서 모두 halo가 관찰되었으나, 나머지 chaperone plasmid를 가지고 있는 균주에서는 halo가 생성되지 않거나 아주 미미한 수준으로 관찰되었다. Fig. 4는 재조합 pCold plasmid와 pGro7을 공동으로 발현시킨 DH5α에 대해 halo plate에서 CalB의 발현을 확인한 것이다.

Table 3. Halo comparison of the cells co-expressing Cal B and chaperone

Chaperone	Strain	DH5α	Rossettagami	Novablue
pKJE7		+	+	-
pGro7		++++	++++	++
pG-KJE8		-	+	-
pTf16		+++	++	+++
pG-Tf2		-	-	-

(++++ : very large, +++ : large, ++ : visible, + : slightly visible, - : not observed)

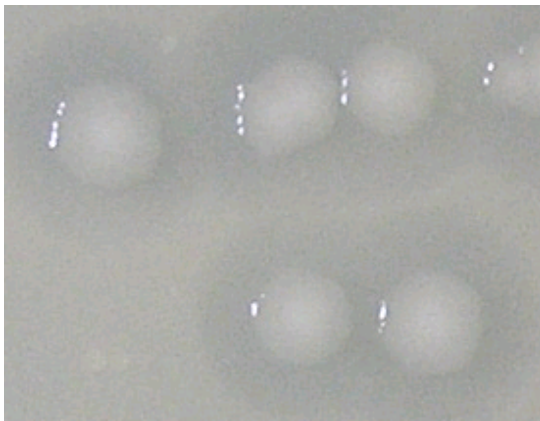


Figure 4. The halo plate test of *E. coli* DH5α having the recombinant pCold plasmid and pGro7 (incubation at 15°C for 24 hour).

SDS-PAGE를 이용한 CalB 발현 확인

Halo 실험결과를 근거로 groES/groEL 유전자를 가지고 있는 pGro7 plasmid와 재조합 pCold I plasmid를 가지고 있는 3종의 균주에 대해 SDS-PAGE를 이용하여 CalB의 발현 여부를 확인하였다. Rossettagami에서 전체 단백질 샘플과 soluble 및 insoluble 샘플에서 모두 CalB의 발현을 확인할 수 있는 33 kDa에서 band를 확인하였다(Fig. 5). Novablue에서는 전체 단백질 샘플과 insoluble 샘플에서만 33 kDa에서 band를 확인할 수 있었다(Fig. 6). Novablue에서는 groES/groEL 유전자를 가지고 있어도 soluble한 형태의 CalB 발현이 어렵

다고 볼 수 있다. DH5α는 Rossettagami와 같이 soluble sample에서 33 kDa의 band를 확인할 수 있었다(Fig. 7).

본 실험을 통해 3종의 균주에서 모두 내포체에 CalB를 포함하고 있음을 확인하였으며, groES/groEL이 동시에 발현되는 경우에는 Rossettagami와 DH5α에서 soluble한 형태의 CalB가 발현됨을 확인하였다. 이중항결합의 생성이 강화된 Rossettagami가 3개의 이중항결합을 가지고 있는 CalB의 발현에 더 적합할 것이라 예상하였으나, DH5α와 비교하면 큰 차이는 보이지 않음에 따라 Rossettagami와 DH5α가 모두 soluble한 형태의 CalB 발현에 적당한 균주라고 할 수가 있다.

그러나 Rossettagami나 Novablue의 경우에는 colony가 형성되는 시간이 DH5α에 비해 50% 이상 길게 걸리나, *E. coli*의 대표적인 균주인 DH5α의 경우 세포가 빠르게 자라 LB agar plate에서 colony를 형성하는 시간이 짧아 다른 균주에 비해 취급이 용이하고 안정적인 균주이다. 또한 Rossettagami나 Novablue는 chaperone 유전자가 도입된 후에 CalB 유전자가 도입될 경우에만 재조합 균주를 얻을 수가 있었으나, DH5α의 경우 CalB와 chaperone 유전자의 도입순서에 상관없이 재조합 균주를 얻을 수가 있었다. 결론적으로 groES/groEL의 동시 발현을 통해 soluble한 CalB의 발현이 가능하며, 신속하고 안정적으로 재조합 균주의 생성이 가능한 DH5α가 CalB의 발현시스템 구축에 더 효율적이라고 할 수 있다.

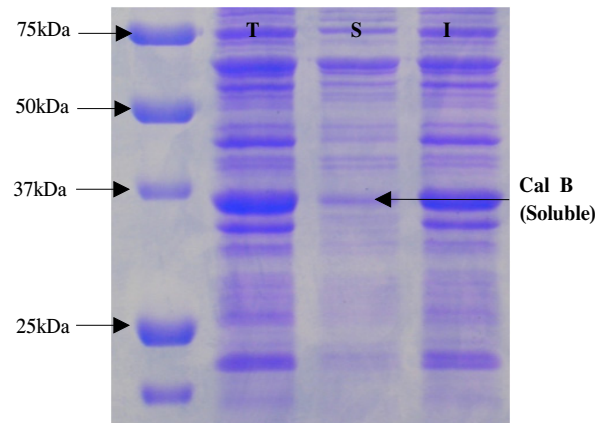


Figure 5. SDS-PAGE analysis results of Rossettagami having the recombinant pCold plasmid and pGro7 (T: total, S: soluble, I: insoluble).

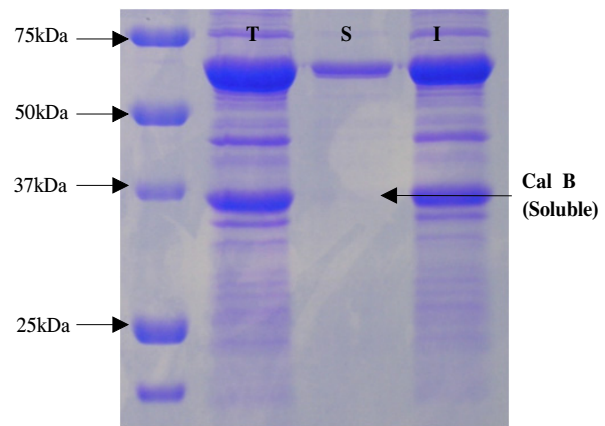


Figure 6. SDS-PAGE analysis results of Novablue having the recombinant pCold plasmid and pGro7 (T: total, S: soluble, I: insoluble).

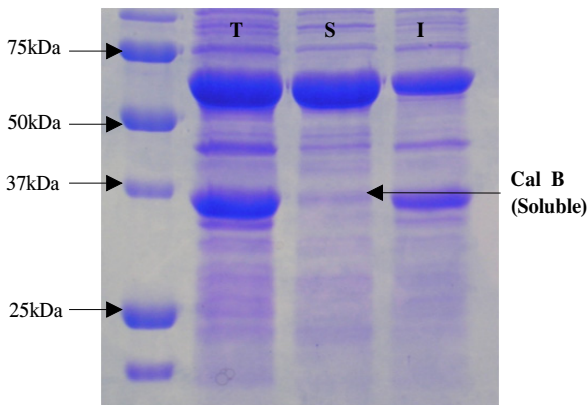


Figure 7. SDS-PAGE analysis results of *E. coli* DH5 α having the recombinant pCold plasmid and pGro7 (T: total, S: soluble, I: insoluble).

요약

본 연구에서는 현재 산업적 응용이 활발하게 이루어지고 있고, 여러 장점을 지닌 효소인 *Candida antarctica*에서 유래된 lipase B (CalB)의 신속한 개질을 위해 취급이 용이한 *E. coli*를 이용하여 CalB 발현시스템을 구축하였다. *E. coli* 발현 시스템에서 효소활성을 지니지 못하는 내포체를 생성하는 단점을 지니고 있어, soluble한 형태의 CalB 생성을 위해 저온 발현이 가능한 pCold I vector와 단백질 접힘을 도와주는 chaperone을 사용하여 CalB를 발현하였다. Liu 등(17)은 *E. coli* Origami2와 B, 그리고 DH5 α 를 실험한 결과, Origami 균주에서만 CalB에 의한 halo의 형성이 관찰되었으나, 동 연구에서는 실험한 3종의 균주와 5종의 chaperone plasmid 중 RosettaGami와 DH5 α 에서 groES/groEL chaperone이 CalB와 동시에 발현되면 soluble한 형태의 Cal B가 발현됨을 관찰할 수 있었다. 또한 신속한 CalB의 발현시스템을 구축하기 위해서는 유전자 조작의 용이성 및 안정성에서 우월한 DH5 α 가 RosettaGami에 비해 soluble한 CalB의 발현에 더욱 적합한 균주임이 관찰되었다. 즉 재조합 pCold plasmid와 pGro7 plasmid (groES/groEL)로 형질이 전환된 DH5 α 가 CalB 발현시스템에 가장 적합하다.

감사

이 연구는 2007학년도 홍익대학교 학술연구진흥비 및 산업자원부 차세대신기술개발사업 (10028375)의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Dannert Schmidt (1999), Recombinant microbial lipase for biotechnological applications, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **7**, 2123-2130.
- Jaeger, K. E., S. Ransac, B. W. Dijkstra, C. Colson, M. Henvel, and O. Misset (1994), Bacterial lipases, *FEMS Microbiology Reviews*. **15**, 29-63.
- Rapp P. and S. Backhaus (1992), Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeast, and bacteria, *Enzyme and Microbial Technology*. **14**, 938-943.
- Kim Sok-Joong, Sang-Min Jung, Yong-Cheol Park, and Kyungmoon Park (2007), Lipase catalyzed transesterification of soybean oil using ethyl acetate, an alternative acyl acceptor, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **12**, 441-445.
- Jaeger K. E., B. W. Dijkstra, and M. T. Reetz (1999), Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases, *Annual Review of Microbiology*. **53**, 315-351.
- Jaeger K. E. and M. T. Reetz (1998), Microbial lipases form versatile tools for biotechnology, *Trends in Biotechnology*. **16**, 396-403.
- Svendsen A. (2000), Lipase protein engineering, *Biochimica Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*. **1543**, 223-238.
- Schmid R. D. and R. Verger (1998), Lipases: interfacial enzymes with attractive applications, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **37**, 1608-1633.
- Reetz M. T. (2002), Lipases as practical biocatalysts, *Current Opinion in Chemical Biology*. **6**, 145-150.
- Fukuda Hideki, Akihiko Kondo and Hideo Noda (2001), Biodiesel fuel production by transesterification of oils, *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **92**, 405-416.
- Baneyx F. and Mujacic M. (2004), Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*, *Nature Biotechnology* **22**, 1399-1408.
- Shin, Eun-Jung, So-Lim Park, Sung-Jong Jeon, Jin-Woo Lee, Young-Tae Kim, Yeon-Hee Kim, and Soo-Wan Nam (2006), Effect of molecular chaperones on the soluble expression of Alginate Lyase in *E. coli*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **11**, 414-419.
- Invitrogen, <http://www.invitrogen.com>.
- Novagen, <http://www.merckbiosciences.com>.
- Takara, Cold shock expression system pCold DNA manual, pp1-9.
- Takara, Chaperone plasmid set manual, pp1-7.
- Liu, D., R. D. Schmid, and M. Rusnak (2006), Functional expression of candida antarctica lipase B in the *Escherichia coli* cytoplasm-a screening system for a frequently used biocatalyst, *Appl Microbiol Biotechnol.* **72**, 1024-1032.